

REMARKS

Claims 1-14 are pending in the application. Claim 1 is allowed; claims 2, 4, 11 and 14 are rejected; and claims 3, 5-9 and 13 are withdrawn.

Applicants have amended claims 2, 4, 10, and 14 in this reply. No new matter has been introduced by this amendment. Support for the claim amendments may be found in the specification as follows.

Claim	Limitation	Support
14	<i>R. equi</i> <i>S. acrimycini</i> <i>S. aculeolatus</i> <i>S. alanosinicus</i> <i>S. albireticuli</i> <i>S. albofaciens</i> <i>S. albogriseolus</i> <i>S. alboniger</i> <i>S. albus</i> <i>S. ambofaciens</i> <i>S. aminophilus</i> <i>S. anandii</i> <i>S. argenteolus</i> <i>S. bambergiensis</i> <i>S. capillispiralis</i> <i>S. carpinesis</i> <i>S. catenulae</i> <i>S. cellulosa</i> <i>S. chartreusis</i> <i>S. chattanoogensis</i> <i>S. cinereoruber</i> <i>S. cinnamomensis</i> <i>S. cirratus</i> <i>S. coeruleorubidus</i> <i>S. collinus</i> <i>S. corchorusii</i> <i>S. diastaticus</i> <i>S. djakartensis</i>	Page 16, Table 1

Claim	Limitation	Support
14	(continued) <i>S. erumpens</i> <i>S. fulvissimus</i> <i>S. galilaeus</i> <i>S. griseochromogenes</i> <i>S. griseolus</i> <i>S. griseoviridis</i> <i>S. humiferus</i> <i>S. hygrosopicus</i> <i>S. minutiscleroticus</i> <i>S. murinus</i> <i>S. nodosus</i> <i>T. paurometabola</i>	(continued) Page 16, Table 1
14	<i>S. acidiscabies</i> <i>S. bottropensis</i> <i>S. disastatochromogenes</i> <i>S. neyagawaensis</i> <i>S. scabiei</i> <i>S. turgidiscabies</i> <i>S. acidiscabies</i> <i>S. bottropensis</i>	Page 17, Table 2

Based on the above amendments and the following arguments, Applicants respectfully request the Examiner enter this amendment under 37 C.F.R. § 1.116 and reconsider all the outstanding rejections, placing claims 1, 2, 4, 10, and 14 in condition for allowance.

I. Objection under 35 U.S.C. § 132(a)

The Examiner has objected to Applicants' previous amendment of the specification under 35 U.S.C. § 132(a). In particular, the Examiner alleged that the correction of the GenBank Accession Number from AF35257 to AF352578 introduced new matter. Allegedly, a skilled artisan would not recognize the appropriate correction.

Applicants maintain the position that a skilled artisan can reasonably recognize the correction of the Accession Number AF35257 with simple trials, after the initial search failed to generate any result. For example, a skilled person may search in the database with the keywords of "AF35257" and "T. paurometabola," resulting in a list of nucleotides with only one of them resembling the recited accession number. See Attachment 1. Similarly a search of "Tsukamurella paurometabola" or "AF35257*" both yield less than 14 hits. See Attachments 2-3. Applicants assert that it would have been well within the skill of the ordinary artisan to realize that a typographical error had been made and locate the correct accession number.

In addition, Applicants would like to direct the Examiner's attention to the disclosure of the foreign priority document KR2003-24656 (Attachment 4). The corresponding Korean Patent recites the correct Accession Number on page 7, line 1 (AF352578). It is clear that AF35257 in the specification is a typographical error made during the translation from Korean to English. Applicants kindly ask the Examiner to allow this amendment intended to cure this typographical error of minor, clerical nature.

II. Enablement Rejection

The Examiner rejected claim 2 under 35 U.S.C. § 112, first paragraph, allegedly because the recitation of GenBank Accession Numbers do not provide for a fixed sequence. Applicants would like to remind the Examiner that the GenBank database has only recorded one single version for the sequences of X95971, M76658 and AF352578 at present and at the time of filing of this application. Because there has not

been any updates to these sequences, Applicants submit that the recitation of the particular accession numbers does provide adequate support for enablement.

Nevertheless, Applicants have amended claim 2 to delete the recitation. Applicants therefore request that this rejection be withdrawn.

III. Written Description Rejection

The Examiner has rejected claims 2, 4, 11 and 14 under 35 U.S.C. § 112, first paragraph, as allegedly lacking written description support in the specification. Applicants respectfully traverse this rejection in view of the amendments and arguments made herein.

A. Claim 2

The Examiner alleged that the claim language of “optionally additional nucleotide sequence comprising the complement of adjacent nucleotide sequence of *S. lividians*...” does not find support in Example 1. The Examiner asserts that the specification only teaches primers as disclosed in SEQ ID NOs: 1 and 2. In response, Applicants have removed the recitation of optionally additional nucleotide sequences.

B. Claim 4

The Examiner alleged that claim 4, which recites an isolated *groEL2* gene fragment derived from a potato scab pathogenic microorganism comprising SEQ ID NO: 43, does not find support in the specification. The Examiner believes that partial gene sequence of SEQ ID NO: 43 does not represent the genus of sequences encompassed by the claims which could be derived from potato scab microorganisms. Specifically,

the Examiner appears to be concerned that the term “derived” indicates that the sequences could be changed from the original potato scab microorganism sequences.

By this amendment, Applicants have removed term “derived,” and also replaced “a potato scab pathogenic microorganism” with “*S. scabiei*,” from which SEQ ID NO: 43 is isolated. See SEQ ID NO: 43. The additional sequence contemplated by Applicants are from *S. scabiei* and are those naturally found in addition to SEQ ID NO: 43.

C. Claim 14

The Examiner has also rejected claim 14, allegedly because the species disclosed are not representative of the large genus encompassed by the claims. Specifically, the Office argues that the skilled artisan would not be able to envision the structure of these sequence simply based on the disclosure of SEQ ID NOs: 1 and 2. Applicants have amended the claim to recite all the species which are subject to the identification method in accordance with the present invention. Table 1 and 2 provide a list of the species analyzed by using primers in accordance with the present invention. Applicants assert that the claim is now placed in condition for allowance and request the rejection be withdrawn.

IV. Claim 10

The Office has failed to examine claim 10 in the previous Office Action. Regardless, Applicants have amended claim 10, which now recites very similar language to amended claim 2, except it uses the traditional claim transition term “consisting essentially of.”

V. Conclusion

Applicants submit that the proposed amendments of claims do not raise new issues or necessitate the undertaking of any additional search by the Examiner, since all of the elements and their relationships claimed were either earlier claimed or inherent in the claims as examined. Therefore, this amendment should allow for immediate action by the Examiner.

In addition, Applicants submit that the entry of the amendment would place the application in better form for appeal, should the Examiner dispute the patentability of the pending claims.

In view of the foregoing remarks, Applicants submit that their claimed invention, as amendment is neither anticipated nor rendered obvious in view of the prior art references cited against this application. Applicants therefore request the entry of the amendment, the Examiner's reconsideration and reexamination of the application, and the timely allowance of the pending claims.

Please grant any extensions of time required to enter this response and charge any additional required fees to our deposit account 06-0916.

Respectfully submitted,

FINNEGAN, HENDERSON, FARABOW,
GARRETT & DUNNER, L.L.P.

Dated: March 15, 2007

By: Rebecca M. McNeill
Rebecca M. McNeill
Reg. No. 43,796

Attachments:

1. Search result of "AF35357" and "*T paurometabola*" in GenBank database. (2 pages)
2. Search result of "*Tsukamurella paurometabola*" in GenBank database. (2 pages)
3. Search result of "AF35357*" in GenBank database. (2 pages)
4. KR2003-24656 (23 pages)

NCBI Nucleotide

My NCBI [Sign In] [Register]

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy Books

Search Nucleotide for AF35257 T paurometabola [Go] [Clear] [Save Search]

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display Summary Show 20 Send to

All: 14 bacteria: 14 mRNA: 0 RefSeq: 0

Show only records from: CoreNucleotide (14), EST (0), GSS (0). [What's this?]

Items 1 - 14 of 14 One page.

☐ 1: AB014264 Reports Links
Tsukamurella paurometabola gyrB gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain IFO 16083
gi|119226161|dbj|AB014264.1|[119226161]

☐ 2: Z37151 Reports Links
T.paurometabola gene for 16S ribosomal RNA
gi|1143604|emb|Z37151.1|[1143604]

☐ 3: Z36933 Reports Links
T.paurometabolum gene for 16S ribosomal RNA
gi|1019829|emb|Z36933.1|[1019829]

☐ 4: AY299165 Reports Links
Tsukamurella paurometabola strain KCTC 9821 heat shock protein 65 (hsp65) gene, partial cds
gi|34333368|gb|AY299165.1|[34333368]

☐ 5: AY956797 Reports Links
Tsukamurella paurometabola 23S ribosomal RNA gene, partial sequence
gi|66393914|gb|AY956797.1|[66393914]

☐ 6: AY876131 Reports Links
Tsukamurella paurometabola strain DSM 20162 cytochrome c oxidase subunit 1 gene, partial cds
gi|62466029|gb|AY876131.1|[62466029]

☐ 7: AY876150 Reports Links
Tsukamurella paurometabola strain DSM 20162 CTP synthase gene, partial cds
gi|62360794|gb|AY876150.1|[62360794]

☐ 8: AY262291 Reports Links
Tsukamurella paurometabola clone F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

About Entrez
Entrez Nucleotide Help | FAQ
Entrez Tools
Check sequence revision history
LinkOut
My NCBI (Cubby)
Related resources BLAST
Reference sequence project
Search for Genes
Submit to GenBank
Search for full length cDNAs

gi|37790688|gb|AY262291.1|[37790688]

- ☐ 9: [X80628](#) Reports Links
Tsukamurella paurometabola 16S rRNA gene, strain DSM20162T
gi|671658|emb|X80628.1|[671658]
- ☐ 10: [X53207](#) Reports Links
Tsukamurella paurometabolum (Rhodococcus aurantiacus) partial 16S rRNA
gi|48221|emb|X53207.1|[48221]
- ☐ 11: [X53206](#) Reports Links
Tsukamurella paurometabolum (Corynebacterium p.) partial 16S rRNA
gi|48220|emb|X53206.1|[48220]
- ☐ 12: [AF283280](#) Reports Links
Tsukamurella paurometabola 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
gi|13560299|gb|AF283280.1|AF283280[13560299]
- ☐ 13: [AF352578](#) Reports Links
Tsukamurella paurometabola heat shock protein 60 (hsp60) gene, complete cds
gi|13310800|gb|AF352578.1|AF352578[13310800]
- ☐ 14: [Z46751](#) Reports Links
T.paurometabola gene for 16S ribosomal RNA
gi|1771845|emb|Z46751.1|[1771845]

Display: [Summary](#) ☒ Show: 20 ☒ Send to ☒

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

NCBI Nucleotide

My NCBI [Sign In] [Register]

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy Books

Search Nucleotide for Tsukamurella paurometabola Go Clear Save Search

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display Summary Show 20 Send to

All: 14 bacteria: 14 mRNA: 0 RefSeq: 0

Show only records from: CoreNucleotide (14), EST (0), GSS (0) [What's this?]

Items 1 - 14 of 14 One page.

☐ 1: AB014264 Reports Links
Tsukamurella paurometabola gyrB gene for DNA gyrase B subunit, partial cds, strain IFO 16083
gi|119226161|dbj|AB014264.1|[119226161]

☐ 2: Z37151 Reports Links
T.paurometabola gene for 16S ribosomal RNA
gi|1143604|emb|Z37151.1|[1143604]

☐ 3: Z36933 Reports Links
T.paurometabolum gene for 16S ribosomal RNA
gi|1019829|emb|Z36933.1|[1019829]

☐ 4: AY299165 Reports Links
Tsukamurella paurometabola strain KCTC 9821 heat shock protein 65 (hsp65) gene, partial cds
gi|34333368|gb|AY299165.1|[34333368]

☐ 5: AY956797 Reports Links
Tsukamurella paurometabola 23S ribosomal RNA gene, partial sequence
gi|66393914|gb|AY956797.1|[66393914]

☐ 6: AY876131 Reports Links
Tsukamurella paurometabola strain DSM 20162 cytochrome c oxidase subunit 1 gene, partial cds
gi|62466029|gb|AY876131.1|[62466029]

☐ 7: AY876150 Reports Links
Tsukamurella paurometabola strain DSM 20162 CTP synthase gene, partial cds
gi|62360794|gb|AY876150.1|[62360794]

☐ 8: AY262291 Reports Links

About Entrez
Entrez Nucleotide Help | FAQ
Entrez Tools
Check sequence revision history
LinkOut
My NCBI (Cubby)
Related resources BLAST
Reference sequence project
Search for Genes
Submit to GenBank
Search for full length cDNAs

Tsukamurella paurometabola clone F1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
gi|37790688|gb|AY262291.1|[37790688]

☐ 9: [X80628](#) Reports

[Links](#)

Tsukamurella paurometabola 16S rRNA gene, strain DSM20162T
gi|671658|emb|X80628.1|[671658]

☐ 10: [X53207](#) Reports

[Links](#)

Tsukamurella paurometabolum (Rhodococcus aurantiacus) partial 16S rRNA
gi|48221|emb|X53207.1|[48221]

☐ 11: [X53206](#) Reports

[Links](#)

Tsukamurella paurometabolum (Corynebacterium p.) partial 16S rRNA
gi|48220|emb|X53206.1|[48220]

☐ 12:
[AF283280](#)

Reports

[Links](#)

Tsukamurella paurometabola 16S ribosomal RNA gene, complete sequence
gi|13560299|gb|AF283280.1|AF283280[13560299]

☐ 13:
[AF352578](#)

Reports

[Links](#)

Tsukamurella paurometabola heat shock protein 60 (hsp60) gene, complete cds
gi|13310800|gb|AF352578.1|AF352578[13310800]

☐ 14: [Z46751](#) Reports

[Links](#)

T.paurometabola gene for 16S ribosomal RNA
gi|1771845|emb|Z46751.1|[1771845]

Display [Summary](#)

Show

20

Send to

[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

3/12/2007 1:17 PM

NCBI Nucleotide

All Databases PubMed Nucleotide Protein Genome Structure PMC Taxonomy Books

Search: Nucleotide for af35257* Go Clear Save Search

Limits Preview/Index History Clipboard Details

Display: Summary Show 20 Send to

All: 10 bacteria: 2 mRNA: 6 RefSeq: 0

Show only records from: CoreNucleotide (10), EST (0), GSS (0). [What's this?]

Items 1 - 10 of 10 One page.

☐ 1: AF352571 Reports Links
Hepatitis D virus strain TW2683 (83L) delta antigen gene, complete cds
gi|28628392|gb|AF352571.1|[28628392]

☐ 2: AF352570 Reports Links
Hepatitis D virus strain TW1629 (16L) delta antigen gene, complete cds
gi|28628390|gb|AF352570.1|[28628390]

☐ 3: AF352575 Reports Links
Gossypium arboreum putative sterol 4-alpha-methyl-oxidase mRNA, complete cds
gi|27448144|gb|AF352575.1|[27448144]

☐ 4: AF352574 Reports Links
Bombyx mori aminopeptidase N3 (APN3) mRNA, complete cds
gi|19070648|gb|AF352574.1|[19070648]

☐ 5: AF352576 Reports Links
Homo sapiens CARD-containing MAGUK protein CARMA1 mRNA, complete cds
gi|17046298|gb|AF352576.1|AF352576[17046298]

☐ 6: AF352579 Reports Links
Mus musculus helix-loop-helix protein E47 mRNA, complete cds
gi|13310808|gb|AF352579.1|AF352579[13310808]

☐ 7: AF352573 Reports Links
Mus musculus CPI17 (Cpi17) mRNA, complete cds
gi|13625938|gb|AF352573.1|AF352573[13625938]

☐ 8: Reports Links

About Entrez
Entrez Nucleotide
Help | FAQ
Entrez Tools
Check sequence
revision history
LinkOut
My NCBI (Cubby)
Related resources
BLAST
Reference sequence
project
Search for Genes
Submit to GenBank
Search for full length
cDNAs

AF352572

Rattus norvegicus CPI17 (Cpi17) mRNA, complete cds
gi|13625936|gb|AF352572.1|AF352572[13625936]

☐ 9:

Reports

Links

AF352578

Tsukamurella paurometabola heat shock protein 60 (hsp60) gene, complete cds
gi|13310800|gb|AF352578.1|AF352578[13310800]

☐ 10:

Reports

Links

AF352577

Nocardia farcinica heat shock protein 60 (hsp60) gene, complete cds
gi|13310798|gb|AF352577.1|AF352577[13310798]

Display

Summary



Show

20



Send to



[Disclaimer](#) | [Write to the Help Desk](#)
[NCBI](#) | [NLM](#) | [NIH](#)

3/12/2007 10:00

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl. ⁷ C12Q 1/68	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2005년12월07일 10-0534042 2005년11월30일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자	10-2003-0024656 2003년04월18일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-2004-0090675 2004년10월26일
------------------------	--------------------------------	------------------------	--------------------------------

(73) 특허권자	한국생명공학연구원 대전 유성구 어은동 52번지
(72) 발명자	김범준 서울특별시 은평구 갈현2동 227-34호 김창진 대전광역시 유성구 도룡동 391 타운하우스 7동 203호 고영환 제주도 제주시 아라1동 1709-1 염광아파트 9-403
(74) 대리인	백남훈 이학수

출원인: 한국생명공학연구원

(54) groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법

요약

본 발명은 groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 제조하고, 이를 이용하여 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

본 발명은 기존의 형태학적 분류법이 갖는 시간, 정확성의 문제점을 해소하며, 또한 요즘 일반적으로 사용되고 있는 16S rDNA 동정법의 갖는 시간, 비용상의 문제점을 해결하여 간편하고, 경제적이며 정확성이 높은 동정법을 제공함으로써 향후 스트렙토미세스 속 균종의 동정에 널리 이용될 수 있다.

배경기술

도 5

색인어

groEL2 유전자, 특이적 프라이머

명세서

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 사용한 groEL2 유전자 분절 및 프라이머 위치를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 스트렙토미세스 속 특이적 프라이머를 이용한 표준균주 DNA의 648-bp groEL2 유전자 분절 증폭 산물을 전기영동 사진으로 나타낸 것이다.

도 3은 groEL2 420-bp 염기서열로 완성된 표준균주 40주의 계통도를 나타낸 것이다.

도 4는 유도 아미노산 140개로 완성된 표준균주 40주의 계통도를 나타낸 것이다.

도 5는 groEL2 420-bp 분절을 이용하여 비교염기서열 분석법에 의한 5주 비표준균주의 동정 결과를 나타낸 것이다.

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 제조하고, 이를 이용하여 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

천연물질의 분리, 동정에 대한 집중적인 연구와 기술의 발전에 의하여 현재 미생물에서 분리된 항생물질이 10,000여 종으로 큰 부분을 차지하고 있다. 또한, 새로운 연구방법과 기술의 계속적인 발전, 새로운 분리원의 발견 그리고, 미생물 대사산물의 수의학과 농업에의 적용 등으로 미생물을 이용한 항생물질의 개발에 지속적으로 기여하여 왔다.

일반적으로 항생물질은 Tyndall에 의해서 미생물 상호간의 길항작용이 관찰된 후 1929년 Fleming에 의해 발견된 페니실린(penicillin)을 기초로 하여 Waksman과 Woodruff(1940)가 스트렙토미세스 안티바이오더커스(*S. antibioticus*)에서 액티노마이신(actinomycin)을 분리하고, Schatz와 Wakman(1944)이 스트렙토미세스 그리세어스(*S. griseus*)에서 스트렙토마이신(streptomycin)을 분리하여 폐결핵의 치료약으로 사용하면서 스트렙토미세스 속 균종은 항생물질의 생산균으로서 산업적으로나 의학적으로 중요한 미생물로 다루어지게 되었다. 스트렙토미세스 속 균종은 2차 대사산물의 다양성으로 인하여 생리활성 물질의 종류도 다양하다. 지금까지 미생물로부터 탐색된 10,000여 종의 생리활성 물질 가운데 약 2/3 정도가 스트렙토미세스 속 균종으로부터 발견되었을 정도로 각종 생리활성물질의 탐색에 있어서 이들이 차지하는 비중은 매우 크다. 이러한 이유 때문에 생물소재산업에 있어서 산업적으로 가장 중요한 미생물 군으로 부각되고 있다.

미생물 중에서 스트렙토미세스 속 균은 그 종(species)이 세균 중에서 가장 다양할 뿐만 아니라, 같은 종 내에서도 서로 다른 생리대사능력을 보유하고 있다[Anderson AS, Wellington EM. The taxonomy of Streptomyces and related genera. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 2001, 51(3):797-814]. 따라서, 많은 종류의 생리활성물질이 방선균의 대사산물로부터 개발되고 있으며, 농수산업(육종, 병충해 방제 등), 환경산업(폐기물 분해처리), 정밀화학산업(공업화학약품), 식품산업(원료, 첨가제 등), 반도체산업(biosensor), 그리고 의약업 등에서 활용될 수 있는 잠재력도 크다. 천연물을 각종 질병의 예방, 완화 또는 치료의 목적으로 이용하고자 하는 연구가 근래에 들어 적극적으로 이루어져 오고 있다[1. Emmert EA, Handelsman J. Biocontrol of plant disease: a (gram-) positive perspective. FEMS Microbiol. Lett. 1999; 171(1):1-9. 2. Nielsen J. Metabolic engineering: techniques for analysis of targets for genetic manipulations. Biotechnol. Bioeng. 1998;58(2-3):125-32. 3. Hutchinson C, Colombo A. Genetic engineering of doxorubicin production in Streptomyces peucetius. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 1999, Jul;23(1):647-652]. 이러한 목적에 접근하는 방법 중에 하나는 다양한 생물자원을 확보하는 것이다. 생물체 중에서도 생리적 다양성, 산업화 가능성 등을 고려할 때, 스트렙토미세스 속 균의 활용분야가 매우 큰 부분을 차지하고 있다.

생물학적 다양성에 관한 국제협약은 생물다양성의 보존과 지속 가능한 이용 그리고, 유전자원을 이용하여 얻은 이익의 공정분배에 관한 것으로, 세계 각국의 생물자원 보존에 관심을 가지고 있다. 자연환경의 오염 정도가 점차 심각해지고 있는 실정에서 국내의 미생물 자원을 확보, 보존하는 작업이 시급함을 알 수 있다. 미생물자원의 수집, 보존 필요성을 더욱 강조하는 측면에서 본다면, 1980년도부터 미국은 미생물에 대한 특허권을 인정하고 있으며, 국내에서도 1987년도부터 미생물이 특허의 대상이 되고 있다.

미생물에 대한 특허권을 확보하는 데에는 물론 그 미생물이 생산하는 특이적인 생리활성물질도 중요하지만, 그 미생물의 정확한 계통 발생학적인 위치(혹은 분류) 또한 중요하다.

현재의 스트렙토미세스 속 균종에 의한 새로운 물질의 스크리닝은 물질 위주로 수행되기 때문에 기존의 특허물질과 중복되는 경우가 상당히 많다. 따라서, 이러한 신물질 탐색방법은 이 방선균의 분류 동정에 의해 새로운 종이나 새로운 균주(strain)가 결정된 후에 수행되어야 확률적으로 다양한 신물질을 획득할 가능성이 높다고 할 수 있다. 일반적으로 요즘은 스트렙토미세스 속 균종의 분류는 기존의 표현형적(phenotypic) 특성에 따라 생리학적, 형태학적 혹은 생화학적 특성을 통한 수치 분류법(numerical taxonomy)에 기초하고 있다.

그러나, 상기 수치 분류법(numerical taxonomy)은 너무 많은 스트렙토미세스 균종과 균 성장속도의 느낌(대장균의 분열 주기: 20분, 스트렙토미세스: 2-3 시간) 때문에 확실하게 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 데 있어서 시간상의 문제 뿐만 아니라 정확성에 있어서 문제점이 보고되고 있다.

이러한 기존 방법의 문제점 때문에, 요즘은 모든 세균의 계통적 관계를 잘 나타내는 표준시계분자(chronometer molecule)를 염기서열 분석방법으로 분석하여 종을 결정하는 분자분류학(molecular taxonomy)방법으로 동정하는 추세이다. 이런 표준시계분자(chronometer molecule)로서 가장 널리 균 동정에 이용되고 있는 것은 16S rDNA 분자이다. 그리고, 현재 스트렙토미세스 속 균종의 동정에도 가장 널리 이용되고 있다.

물론 16S rDNA의 염기서열 결정에 의한 균 동정방법은 현재 기존의 표현형적(phenotypic) 특성을 이용한 수치분류법을 대신하여 가장 널리 이용되고 있다. 현재 병원성균을 비롯한 중요한 균들을 분자생물학적인 방법으로 검출하는 장비(kit)의 표적으로서 16S rDNA 염기서열이 가장 널리 사용되고 있다(미코박테리아균 판별을 위한 유전자 탐침장비 등).

그러나, 이러한 16S rDNA는 여러 가지 단점을 가지고 있다. 첫 번째로, 염기서열 분석에 의한 비교염기서열 분석방법으로 균을 동정하기 위해서는 비록 염기서열 변이가 심한 과변이부위(hypervariable region)가 존재하지만, 정확한 균 동정을 위해서는 전체 1.5 kbp의 염기서열을 분석해야 되기 때문에 시간상 또한 비용상으로 크게 문제가 된다. 이런 단점은 앞으로 DNA 칩에 의한 동정 방법을 개발하는데 있어서 너무나 많은 소중합체 올리고머(oligomer)를 사용해야 한다는 문제점이 있다. 두 번째로, 스트렙토미세스 속과 같이 450 종 이상이 되는 많은 데이터(data)를 분석하기 위해서는 매우 많은 비용이 필요하다. 따라서, 현재 다른 균종들의 16S rDNA의 데이터 베이스(data base)는 현재 유전자은행(Genbank)상에 확실히 확립되어 있지만, 스트렙토미세스 속 균종은 일부 균종을 제외하고는 전체 균종의 데이터(data)가 아직까지 완벽하게 확립되어 있지 않다. 세 번째로, 16S rDNA에 의한 분류 방법의 가장 치명적인 약점으로는 어떤 균종에서는 이들이 전체 염색체 상에서 이중복사 유전자(multi-copy gene)로 존재하고 또한 이렇게 존재하는 대립유전자(allele)의 염기서열이 서로 다른 염기서열로 존재하고 있다는 보고가 있다[Ueda K, Seki T, Kudo T, Yoshida T, Kataoka M. Two distinct mechanisms cause heterogeneity of 16S rRNA. J. Bacteriol. 1999, Jan;181(1):78-82]. 즉 한 균주에서 여러 16S rDNA의 염기서열이 존재한다는 것이다. 이러한 사실은 염기서열 분석상에서 기술적으로 상당한 문제점으로 작용한다. 따라서, 방선균의 표적유전자를 중합효소 연쇄반응으로 증폭시킨 후에 이 산물을 직접적으로 염기서열 분석을 하지 못하고, 반드시 벡터에 클로닝시킨 후 여러 클론을 염기서열분석 해야 한다는 문제점이 있다.

이러한 문제점 때문에 16S rDNA 이외에 방선균의 동정에 이용될 대체 표준시계분자(chronometer molecule)의 선택이 필요하다.

발명의 효과 및 과제

이에, 본 발명자들은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여 연구한 결과, 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 제조하고, 이를 이용하여 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법을 개발함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

따라서, 본 발명은 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머 및 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자 분절을 제공하는데 그 목적이 있다.

또한, 본 발명은 상기 프라이머로 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법을 제공하는데 또 다른 목적이 있다.

발명의 구성 및 작용

본 발명은 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머 및 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자 분절을 그 특징으로 한다.

또한, 상기 프라이머로 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법을 또 다른 특징으로 한다.

이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은 모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자를 증폭시킬 수 있는 특이적 프라이머를 제조하고, 이를 이용하여 groEL2 유전자를 증폭시킨 후 염기서열을 분석하여 데이터베이스를 구축하고, 이 데이터베이스로 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 방법에 관한 것이다.

스트렙토미세스 속 균종을 분류 동정하는데 있어서의 16S rDNA를 대체할 수 있는 대체분자로서 본 발명에서는 GROEL2 단백질을 코딩하는 groEL2 유전자 분절을 사용한다. 상기 유전자는 세균의 스트레스(stress)에 관여하는 단백질을 코딩하고 이 단백질은 세균뿐만 아니라 심지어 인간에게까지 그 기능이 보존된다. 따라서, 유전자 변이가 외부 선택압에 의해 일어난다고 보다는 시간과 관련된 무작위적 변화를 보여주는 표준시계분자(chronometer molecule)로 간주할 수 있다. 즉, groEL2 유전자의 염기서열은 세균간의 계통학적 관계를 잘 나타낼 것으로 생각된다.

기존의 표준시계분자로 널리 사용되던 16S rDNA와 비교하여 본 발명의 groEL2 유전자 분절은 다음과 같은 장점이 있다.

1. 16S rDNA를 표적으로 하여 비교염기서열 분석 방법에 의하여 정확한 균 동정을 하기 위해서는 거의 1.5 kbp 정도의 전체 유전자를 분석해야 한다.

그러나, groEL2 유전자는 단지 420-bp 혹은 423-bp의 염기서열 분석만으로도 정확한 균 동정이 가능하다. 이러한 차이는 동정에 있어서의 비용을 몇 배 절감할 수 있다는 이점이 있다.

2. 스트렙토미세스 속 균종을 동정하는 데 있어서 16S rDNA 분석 방법의 가장 큰 단점은 어느 종에 있어서 한 개체에 유전자가 다중복사(multi-copy)로 존재하고, 또한 이들의 염기서열이 서로 다르기 때문에, 이 종을 분석하는데 있어서는 직접 염기서열 분석방법으로 분석할 수 없다는 문제점이 있다. 이런 경우에는 클로닝 작업 후에 여러 클론을 염기서열분석해야 한다. 따라서 직접 염기서열 분석방법에 비해 노동력과 시간 및 비용이 몇 배가 소모된다.

그러나, groEL2 유전자는 한 개체에 단일한 염기서열만을 갖는 것으로 보고되고 있기 때문에 이러한 단점을 보완할 수 있다.

3. 16S rDNA는 과변이 부위의 염기서열 길이가 서로 다르다. 즉 염기서열 정렬(alignment)상에서 끊어진 곳(gap)이 존재한다.

그러나, 본 연구에서 표적으로 사용할 groEL2 분절은 몇 개 종을 제외한 거의 모든 스트렙토미세스 균종이 같은 크기의 염기서열 즉 420-bp만을 가지고 있다. 예외인 균주들도 단지 1개의 아미노산, 즉 3-bp만이 첨가되어 있기 때문에 423-bp의 염기서열을 가지고 있을 뿐이다. 따라서, 이러한 특성은 염기서열 정렬(alignment)이나 염기서열을 결정하는 데 있어서 상당한 장점으로 작용한다.

4. 16S rDNA는 구조유전자이기 때문에 아미노산을 코딩하지 않는다. 따라서, 이 유전자를 이용한 동정방법이 유도된 아미노산을 동정에 이용하지 못하는 반면에, 기능유전자인 groEL2 유전자는 아미노산을 코딩하므로 염기서열 뿐만 아니라 유도된 아미노산도 균 분류에 이용될 수 있다.

5. 16S rDNA에 의한 스트렙토미세스 속 균종의 염기서열 데이터베이스는 1980년 중반부터 수행되어 왔고, 산발적으로 여러 다른 연구자에 의해 수행되어 왔기 때문에 독자적인 데이터베이스를 구축하는 데에는 문제가 많다.

그러나, 본 발명에서 수행된 groEL2 염기서열은 진뱅크(Genbank) 상에서 전부 새로운 것으로 확인되었기 때문에 독자적인 스트렙토미세스 분류용 데이터베이스 구축에 유리할 것으로 사료된다.

또한, 이미 공지된 특허공개번호 제2003-15124호에 사용된 rpoB 유전자 보다 본 발명의 groEL2 유전자는 스트렙토미세스 속에 속하는 두 종간의 염기서열 변이 및 유도 아미노산 변이가 rpoB 유전자보다 크다는 장점이 있어 분류 및 진단에 이용되는 시계표준분자로서 더욱 유리하다.

이와 같은 groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법을 상세히 설명하면 다음과 같다.

본 발명은

- 1) 스트렙토미세스 속 균주의 groEL2 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키는 프라이머를 이용하여 목적 균주의 groEL2 유전자 분절을 증폭하는 단계;
- 2) 상기 증폭된 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 분석하는 단계; 및
- 3) 상기에서 분석된 염기서열과 표준 균주의 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 비교하는 단계를 포함하는 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법에 그 특징이 있다.

상기 1) 단계에서 groEL2 유전자 분절을 증폭시키기 위하여 스트렙토미세스 속에 특이적인 프라이머를 제조하는 데 있어, 현재 전체 groEL2 염기서열이 보고된 스트렙토미세스 리비단스(*S. lividans*)와 스트렙토미세스 알버스(*S. albus*)의 염기서열 및 스트렙토미세스와 계통분류학적으로 밀접한 슈카무렐라 파우로메타볼라(*T. paurometabola*)의 염기서열과 비교하여 가장 염기서열이 잘 보존된 부위를 각각 정방향, 역방향 프라이머로 선정한다. 그 이후에 본 발명에서 분석하고자 하는 스트렙토미세스 표준균주 40종의 DNA를 대상으로 하여 제조된 프라이머를 이용한 중합효소 연쇄반응이 모든 균종에서 648-bp의 증폭산물을 생산하는지를 확인한다.

바람직한 프라이머로는 서열번호 1 또는 서열번호 2로 표시되는 것이다.

상기 스트렙토미세스 속 균주에 특이적인 프라이머를 이용하여 목적 균주의 groEL2 유전자 분절을 PCR 기법으로 증폭하여 염기서열을 분석한다. 이때, 표준 균주의 groEL2 유전자 분절의 데이터베이스는 서열목록상 서열번호 3 내지 서열번호 42로 표시되는 염기서열이다.

표준 균주와 목적 균주의 groEL2 염기서열을 분석한 후에 서열 비교하여 해당 균주인 것으로 결정을 내릴 때, 정렬된 데이터베이스에 동정하고자 하는 균의 염기서열을 분석하여 데이터베이스에 추가시킨 후에 다시 염기서열 정렬을 수행한 후 계통도를 완성하면 해당되는 균종에 근접하여 가치를 형성하게 되어 계통도로 균종을 결정할 수도 있다. 또한, 서열 상동성으로 결정하면 99.8% 이상의 상동성을 보이는 균종으로 동정하는 것도 가능하다. 왜냐하면, 같은 균종 사이의 염기서열 변이가 0.2%를 넘지 않기 때문이다.

본 연구에서 구축된 스트렙토미세스 속 균주 groEL2 데이터베이스를 실제로 분류에 적용될 수 있는지를 검증하기 위하여 비표준 균주 총 5주를 대상으로 groEL2 염기서열을 분석하여 비교염기서열 분석방법으로 동정을 실시한 결과, 비표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스(*S. hydroscopicus*) 3주(KCTC 9030, KCTC 9031, KCTC 9069)는 각각 100%, 99.8%, 99.8%의 염기서열 동질성을 보이면서 계통수상에서 표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스(KCTC 9782)에 위치함을 확인하였다[도 5]. 비표준 균주인 스트렙토미세스 알버스(*S. albus*) 2주(KCTC 1136, KCTC 1533)는 각각 99.8%, 100% 염기서열 동질성을 보이면서 계통수 상에서 표준 균주인 스트렙토미세스 알버스(KCTC 1082)에 위치함을 확인하였다[도 6].

결론적으로, 균 동정에 이용될 수 있는 표준 시계분자의 특성으로는 각 종간의 염기서열 다양성(interspecies variation) 이외에, 같은 종 안에서의 염기서열 보존성(intraspecies conservation)이 확인되어야 한다. 각 종간의 염기서열 다양성은

위에서 상술하였고, 같은 종 안에서의 염기서열 보존성이 5균주의 비표준 균주의 염기서열에 의하여 증명되었다. 5주의 비표준 균주를 각각의 표준 균주와 비교하여 보았을 때, 99.8% ~ 100%의 염기서열 동질성을 보였다. 그리고, 비교염기서열 분석방법에 의해 5 균주의 비표준 균주를 100% 동정할 수 있었다.

따라서, 본 발명은 기존의 형태학적 분류법이 갖는 시간, 정확성의 문제점을 해소하며, 또한 요즘 일반적으로 사용되고 있는 16S rDNA 동정법의 갖는 시간, 비용상의 문제점을 해결하여 간편하고, 경제적이며 정확성이 높은 동정법을 제공함으로써 향후 스트렙토미세스 속 균종의 동정에 널리 이용될 수 있다.

이하, 본 발명은 다음 실시예에 의거하여 더욱 상세히 설명하겠는바, 본 발명이 이에 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

균주

국제적으로 공인된 국내 균주 보관센터인 한국생명공학연구원 유전자은행(KCTC)에서 보관 중인 스트렙토미세스 38 균주, 및 기타 방선균으로서 로도코커스(*Rhodococcus*) 1 균주, 슈카무렐라(*Tsukamurella*) 1 균주 등 총 40개의 표준 균주를 대상으로 groEL2 염기서열을 분석한다. 또한, 구축된 데이터베이스를 이용하여 균주 동정에 이용될 비표준 균주 2종(*S. hygroscopicus*, *S. albus*)의 총 5주의 균주를 대상으로 비교염기서열 분석방법을 수행한다[표 1].

[표 1]

스트렙토미세스 표준 균주					
No	Name	Source	No	Name	Source
1	<i>S. acrimycinii</i>	KCTC 9679 ¹	20	<i>S. cinnamonensis</i>	KCTC 9706 ¹
2	<i>S. aculeolatus</i>	KCTC 9680 ¹	21	<i>S. cinereoruber</i>	KCTC 9707 ¹
3	<i>S. alanosinicus</i>	KCTC 9683 ¹	22	<i>S. citreus</i>	KCTC 9709 ¹
4	<i>S. albitreticuli</i>	KCTC 9744 ¹	23	<i>S. coeruleorubidus</i>	KCTC 1743 ¹
5	<i>S. albolacensis</i>	KCTC 9686 ¹	24	<i>S. collinus</i>	KCTC 9713 ¹
6	<i>S. albogriseolus</i>	KCTC 9675 ¹	25	<i>S. corchorusii</i>	KCTC 9715 ¹
7	<i>S. alboniger</i>	KCTC 9014 ¹	26	<i>S. diasteticus</i>	KCTC 9142 ¹
8	<i>S. albus</i>	KCTC 1082 ¹	27	<i>S. djakartensis</i>	KCTC 9722 ¹
9	<i>S. ambofaciens</i>	KCTC 9111 ¹	28	<i>S. erumpens</i>	KCTC 9729 ¹
10	<i>S. aminophilus</i>	KCTC 9673 ¹	29	<i>S. fulvissimus</i>	KCTC 9779 ¹
11	<i>S. anandii</i>	KCTC 9687 ¹	30	<i>S. galileus</i>	KCTC 1919 ¹
12	<i>S. argenteolus</i>	KCTC 9695 ¹	31	<i>S. griseochromogenes</i>	KCTC 9027 ¹
13	<i>S. bambergiensis</i>	KCTC 9019 ¹	32	<i>S. griseolus</i>	KCTC 9028 ¹
14	<i>S. capillispiralis</i>	KCTC 1719 ¹	33	<i>S. griseoviridis</i>	KCTC 9780 ¹
15	<i>S. carpinensis</i>	KCTC 9126 ¹	34	<i>S. humiferus</i>	KCTC 9116 ¹
16	<i>S. catenulae</i>	KCTC 9223 ¹	35	<i>S. hygroscopicus</i>	KCTC 9782 ¹
17	<i>S. cellulosa</i>	KCTC 9703 ¹	36	<i>S. minutiscleroticus</i>	KCTC 9129 ¹
18	<i>S. chartreusii</i>	KCTC 9704 ¹	37	<i>S. murinus</i>	KCTC 9492 ¹
19	<i>S. chattanoogensis</i>	KCTC 1087 ¹	38	<i>S. nodosus</i>	KCTC 9035 ¹
스트렙토미세스 비표준 균주					
1	<i>S. hygroscopicus</i>	KCTC 9030	4	<i>S. albus</i>	KCTC 1136
2	<i>S. hygroscopicus</i>	KCTC 9031	5	<i>S. albus</i>	KCTC 1533
3	<i>S. hygroscopicus</i>	KCTC 9069			
기타 방선균주					
1	<i>R. equi</i>	KCTC 9082	2	<i>T. paurometabole</i>	KCTC 9821

약어: KCTC: Korean Collection for Type Cultures

실시예 1: 스트렙토미세스 속 특이 groEL2 프라이머의 제조

모든 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2 유전자 분절을 증폭시킬 수 있는 특이적인 정방향 프라이머(STGROF1)와 역방향 프라이머(STGROR2)를 제조하여 사용한다. 스트렙토미세스 속 균종 중에서 다른 목적으로 전체 groEL2 유전자의 염기서열이 분석된 스트렙토미세스 리비단스(GenBank No. X95971), 스트렙토미세스 알버스(GenBank No. M76658) 2주의 염기서열과 계통학적으로 가장 유사한 슈카무렐라(*Tsukamurella*) 속 균종인 슈카무렐라 파우로메타볼라(GenBank No.

AF352578) 1 주와 3 주의 염기서열을 분석하여 모든 스트렙토미세스속 균종을 증폭시킬 수 있는 프라이머쌍 정방향 프라이머 STGROF1(5'-CCATCGCCAAGGAGATCGAGCT-3' 서열번호 1)과 역방향 프라이머 STGROR2(5'-TGAAGGTGCCRCGGATCTTGTT-3' 서열번호 2)를 제조하였다[도 1]. 이 프라이머 쌍은 아직 스트렙토미세스 속 균종의 증폭을 위하여 사용된 적이 없는 새로운 프라이머 쌍이다.

도 1에서는 본 특허에서 사용된 프라이머의 위치를 잘 보여준다. 본 특허에서 증폭한 groEL2 유전자 분절은 스트렙토미세스 알버스 1623-bp 전체 유전자 중에서 161번째 염기서열부터 808-bp번째의 염기서열 총 648-bp의 염기서열을 표적으로 사용하였다. 스트렙토미세스 속 균종의 648-bp의 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 증폭시키기 위하여 각각 스트렙토미세스 알버스의 염기서열 중에서 161번째부터 182번째까지의 총 22개의 염기로 구성된 정방향 프라이머와 787번째 염기서열부터 808번째 염기로 구성되는 총 22개의 염기로 구성된 역방향 프라이머를 이용하였다. 이 두 프라이머 부위는 스트렙토미세스 속 균종에 속하는 스트렙토미세스 리비단스와 스트렙토미세스 알버스와 100% 염기서열 상동성을 보일 뿐만 아니라 다른 속 균종인 슈카무렐라 파우로메타볼라(*T. paurometabola*)와도 100% 상동성을 보이는 계통학적으로 보존된 부위를 사용하였다.

실시예 2: 스트렙토미세스 속 groEL2 420-bp 분절의 제조

1) DNA 추출

BB/P(Bead beater phenol) 방법을 이용하여 DNA를 추출하였다. 균의 집락을 취하여, TEN 버퍼(Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM: pH 8.0)에 부유시킨 후에 직경 0.1 mm 초자구(diameter 0.1 mm; Biospec Products, Bartlesville, Okla., U.S.A.) 100 μ l(packing volume)과 페놀/클로로포름/이소프로필알코올 (50/49/1) 용액 100 μ l를 함께 부유시켜 미니 비터(mini beater)로 1 분간 진탕하여 균체를 파쇄하였다. 균 파쇄액은 12,000 rpm으로 5 분간 원심분리하고 상등액(100 μ l)을 새로운 튜브에 옮긴 후, 60 μ l의 이소프로필알코올을 섞고, 다시 15000 rpm으로 15 분간 원심분리하였다. 침전물은 70% 에탄올로 세척한 후 TE (pH 8.0, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) 버퍼 60 μ l로 DNA를 회수하였다.

2) 중합효소 연쇄반응에 의한 groEL2 유전자 증폭

스트렙토미세스 속에 특이적인 정방향 프라이머(STGROF1)와 역방향 프라이머(STGROR2)를 제조하여 사용하였다. PCR은 2 unit의 Taq 중합효소, 10 mM dNTP, 10 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.5 mM MgCl₂을 포함하는 AccuPower PCR PreMix[Bioneer, Korea]를 이용하였다. 주형 DNA 50 ng, 프라이머 SRPOF1, SRPOR2 각각 20 pmol을 넣고, 최종 부피가 20 μ l가 되도록 증류수를 첨가하여 혼합물을 만들었다. PCR은 첫 번째 변성(denaturation)단계 95 °C 5분, 변성단계 95 °C 1분, 어닐링(annealing) 62 °C 45초, 신장(extension)단계 72 °C 1분 30초 및 최종 신장(final extension) 단계 72 °C 5분으로 30회 수행하였다[Model 9600 thermocycler, Perkin-Elmer cetus]. PCR 후, 1% 아가로스 겔에 전기영동하여 648-bp의 반응산물을 확인하였다.

전기에서 선정된 방선균 속 균종을 증폭시킬 수 있는 프라이머를 이용하여 중합효소 연쇄반응을 수행한 결과 40 주의 표준 균주 전부에서 648-bp의 groEL2 유전자 분절을 생산함을 1% 아가로스 겔 전기영동 상에서 확인할 수 있었다[도 2]. 또한, 스트렙토미세스 속 균종 뿐만 아니라, 회소방선균에 속하는 로도코커스 속 및 슈카무렐라 속 균종도 증폭시킴을 확인할 수 있었다.

3) 중합효소 연쇄반응 산물의 정제

1% 겔에 전기영동 후, 스트렙토미세스 표준균주 648-bp의 반응산물 부위의 겔을 자른 다음 새로운 튜브에 옮겨 DNA를 추출하였다. DNA 추출 및 정제는 Qiaex[Qiagen, Germany] 시스템을 이용하였다. 겔 용해 용액 QX1 500 μ l을 겔이 들어있는 튜브에 첨가한 후 50 °C에 15분간 방치하여 겔을 완전히 녹였다. 그 후 겔 비드를 10 μ l을 첨가하여 완전히 섞은 후에 50 °C에 15분간 방치하였다. 그 사이 1분 간격으로 튜브를 10초씩 볼텍스(vortex)를 수행하여 비드가 골고루 퍼지도록 하였다. 이 후 QX1으로 1번, QF로 2번 세척한 후 45 °C에서 10분간 건조시킨 후 TE 버퍼 20 μ l로 DNA를 회수하였다.

실시예 3: groEL2 분절의 자동염기서열 분석

자동 염기서열 분석은 겔 용출 산물을 주형 DNA로 사용하였다. 주형DNA 60 ng, 프라이머 1.2 pmol, BigDye 터미네이터 사이클 시퀀싱 키트[PE Applied Biosystems] 2 μ l을 섞고, 증류수를 첨가하여 총 부피 10 μ l가 되도록 제조하였다. 반응

은 Perkin Elmer Cetus 9600을 사용하여, 95 °C 10 초, 60 °C 10 초, 60 °C 4 분으로 25 사이클을 실시하였다. 반응이 끝난 시료는 에탄올 침전방법으로 DNA를 정제하였다. 즉, 증류수 180 µl, 3 M 소듐 아세테이트 10 µl을 첨가하여 총 200 µl로 만든 후, 이 혼합물에 2배 부피의 100% 에탄올을 첨가하여 잘 섞은 다음 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 DNA를 침전시켰다. 그 후 70% 에탄올 500 µl을 첨가한 후 15,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 DNA를 세척하였다. 그 후 DNA를 비이온화된 포름이미드(Deionized Formimide)[PE Applied Biosystems]로 회수하였다. 이렇게 정제된 DNA를 95 °C로 5분간 반응하여 단일가닥 DNA로 만든 후, ABI 3100 시스템을 이용하여 2시간 30분 동안 전기영동하여 염기서열을 분석하였다.

염기서열 분석방법은 정방향 프라이머 STGROF1을 사용하여 한쪽으로 염기서열을 분석하였고, 전체 648-bp 중에서 420-bp 혹은 423-bp의 염기서열을 결정하였다.

증폭된 중합효소 연쇄반응 산물을 전기에서 상술한 바 대로 정제한 후 클로닝 과정 없이 직접 자동염기서열분석 방법으로 도 1에서 보여지는 것처럼 스트렙토미세스 알버스의 전체 groEL2 염기서열 순서를 기준으로 232번째 염기에서 631번째 염기까지 420-bp의 염기서열을 분석하였다. 그 결과, 어떤 모호한 결과(표적유전자가 계통 상에 여러 개 존재하고, 그들 사이의 염기서열이 다르면 다른 부위의 염기서열은 직접염기서열 분석상에서 염기서열이 겹쳐 나오기 때문에 정확한 염기서열을 결정할 수 없다) 없이 40주의 표준 균주 모두 420-bp의 염기를 결정할 수 있었다.

이렇게 분석된 염기서열을 다정렬(multialignment)하여 서로의 염기서열을 비교해 본 결과, 첫째 40주 표준 균주 모두 서로 다른 염기서열을 갖고 있었다. 즉, 각 종간 염기서열 다양성(interspecies variation)을 보여준다. 동정의 표적이 되는 유전자는 균종 동정에 이용되기 위해서는 먼저 각 균종 간의 염기서열 다양성이 선행되어야 하는데 본 실험에서 그 조건을 충족시킴을 확인할 수 있었다. 둘째, 스트렙토미세스 알버스의 전체 groEL2 염기서열 순서를 기준으로 301 번째 염기에 아미노산 1개 즉 3-bp(GCG)가 삽입되어 423-bp를 가지고 있는 3주(*S. ambofaciens*, *S. erumpens*, *S. murinus*)를 제외한 37주의 표준 균주 염기서열 모두 다정렬 상에서 염기서열 삽입(insertion)이나, 탈락(deletion) 없이 모두 420-bp의 염기를 코딩하고 있었다. 즉, 다정렬 상에서 어떠한 갭(gap)도 존재하지 않는다는 사실이다. 16S rDNA는 정렬상에서 높은 빈도로 갭이 존재한다. 다정렬할 때 일반적으로 갭은 그 부위에 해당되는 정렬된 유전자를 전부 제거하여 분석하는 경향이 있기 때문에 전체적인 계통수를 구축하는 데에 오류를 일으킬 확률이 높다고 알려져 있다. 따라서, 본 발명에서 사용된 즉 groEL2 유전자의 우수성을 다시 한 번 확인할 수 있다.

140개의 유도 아미노산, 즉 스트렙토미세스 알버스 전체 GROEL2 단백질 순서를 기준으로 78번째 아미노산부터 217번째 아미노산에 해당되는 부위를 다정렬한 결과 위에서 기술한 것처럼 스트렙토미세스 암보파시언스(*S. ambofaciens*), 스트렙토미세스 에룸펜스(*S. erumpens*), 스트렙토미세스 무리너스(*S. murinus*) 3개의 균주만이 스트렙토미세스 알버스 전체 GROEL2 단백질 순서를 기준으로 101번째 위치에 알라닌(alanine)이 첨가되어 141개의 아미노산을 코딩하고 있는 것을 제외하고는 나머지 37 개 표준 균주 모두 140개의 아미노산을 코딩하고 있음을 확인하였다. 또한, 40개의 표준 균주 중에서 아미노산 상동성을 기준으로 33개의 대립유전자가 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 이러한 사실은 아미노산을 코딩하지 못하는 16S rDNA와 다르게 염기서열뿐만 아니라 유도 아미노산을 이용하여도 스트렙토미세스 균종간 감별에 이용할 수 있음을 시사한다.

실시예 4: groEL2 유전자 염기서열의 배열과 염기서열 상동성 분석 및 계통수의 완성

자동 염기서열 분석방법에 의해 분석되어진 40종의 스트렙토미세스 속 표준균주의 groEL2 염기서열(420-bp 혹은 423-bp)을 DNASTAR 소프트웨어의 Megalign 프로그램을 이용하여 다정렬(multialignment)을 수행하여 groEL2 데이터베이스를 구축하였다. 다정렬은 일단 420-bp 염기서열을 Megalign 프로그램에서 140개의 아미노산으로 번역(translation)시킨 후, 이 아미노산을 대상으로 Megalign 프로그램 안의 Clustal Method 방법으로 다정렬시켰다. 이렇게 정렬된 140개의 아미노산을 다시 420개의 염기서열로 변화시켜 방선균 균 동정 데이터베이스를 구축하였다. 40주 염기서열 각각에 대한 염기서열 상동성은 다정렬된 데이터베이스를 Megalign 프로그램 안의 시퀀싱 거리(sequence distance)를 이용하여 분석하였다.

염기서열 다정렬 후 위에 상술한 대로 40주 표준균주의 염기서열 동질성을 조사해보았다. 그 결과 40주 모두 서로 다른 염기서열 동질성을 보였다. 38 개의 스트렙토미세스 속 속하는 균종의 상동성을 분석하여 본 결과, 88.4%(*S. griseolus*와 *S. albus* 사이의 염기서열 동질성)와 99.1%(*S. humiferus*와 *S. ambofaciens* 사이의 염기서열 동질성) 사이의 염기서열 상동성을 보여주었다.

따라서, 스트렙토미세스 속 균종 간에는 0.9 ~ 11.6%까지의 염기서열 이질성을 보임을 확인할 수 있었다. 스트렙토미세스 사이의 염기서열 이질성이 3%를 넘지 않는 16S rDNA에 비해 동정을 위한 표적 유전자의 가장 중요한 특성 중에 하나

인 종간 염기서열 변이(interspecies variation)가 훨씬 높다는 것을 확인할 수 있었다. 38개의 스트렙토미세스 표준 균주의 염기서열을 다른 속에 속하는 로도코커스 에퀴(*R. equi*)와 슈카무렐라 파우로메타볼라(*T. paurometabola*)의 염기서열과 상동성을 비교하여 보았을 때 모두 85.5%(*S. anandii*와 *R. equi*사이의 염기서열 동질성)이하의 상동성을 보임을 확인할 수 있었다

38개의 스트렙토미세스 속에 속하는 유도 아미노산 상동성을 서로 비교하여 보았을 때에 91.4%(*S. griseolus*와 *S. albus*사이의 아미노산 동질성) ~ 100%의 아미노산 상동성을 보여주었고, 이들을 다른 속에 속하는 로도코커스 에퀴와 슈카무렐라 파우로메타볼라의 아미노산과 상동성을 비교하여 보았을 때 모두 87.9%(*S. anandii*와 *R. equi*사이의 염기서열 동질성) 이하의 상동성을 보임을 확인할 수 있었다

각 균종 사이의 계통학적 유연관계(phylogenetic relationship)는 계통수(phylogenetic tree)를 통하여 분석하였다. 계통수는 MEGA 소프트웨어를 이용하여 구축하였다. 다정렬된 40 주 420-bp 염기서열을 Juke-Cantor 거리 측정법과 pairwise deletion 방법에 기초를 둔 Neighbor-Joining법으로 분석하여 계통수를 작성하였다. 부트스트랩(Bootstrap) 분석은 100 복제(replication)로 수행하였다.

유도 아미노산 염기서열 상동성과 계통수는 420-bp의 유전자 염기서열을 Megalign 프로그램에서 140개의 아미노산으로 번역(translation)시킨 후, Megalign 프로그램 안의 Clustal Method 방법으로 다정렬시켜 분석하였다.

다정렬된 40주의 염기서열을 위에서 상술한대로 Mega 소프트웨어를 이용하여 Neighbor-Joining 계통수를 구축하였다. 전체 계통수를 분석하였을 때 40주 모두 다른 염기서열을 보이면서 40개의 독특한 분절을 보이는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 38주의 스트렙토미세스 속 균주가 다른 속에 속하는 로도코커스 에퀴와 슈카무렐라 파우로메타볼라에 대해 독립적인 하나의 그룹을 형성함을 확인할 수 있었다[도 3].

유도 아미노산을 Megalign 프로그램 안의 Clustal Method 방법으로 다정렬시켜 분석한 결과 40주의 표준 균주 중에서 서로 다른 아미노산을 코딩하는 33 개의 대립유전자가 같은 수의 분절을 형성함을 확인할 수 있었다. 마찬가지로 33개의 분절은 다른 속에 속하는 로도코커스 에퀴와 슈카무렐라 파우로메타볼라에 대해 독립적인 하나의 그룹을 형성함을 확인할 수 있었다[도 4].

실시예 5: 40종의 표준 균주 데이터베이스를 이용한 비교 염기서열 분석방법에 의한 비표준 균주 동정 실시

상기 표 1에 나타난 바와 같이 비표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스 3주(KCTC 9030, KCTC 9031, KCTC 9069) 및 스트렙토미세스 알버스 2주(KCTC 1136, KCTC 1533)의 총 5주를 대상으로 균 동정을 실시하였다. 균 동정은 각각의 균주의 420-bp의 groEL2 염기서열을 전기에서 상술한 방법대로 결정한 다음, 40주의 염기서열이 축적되어 있는 DNASTAR 소프트웨어의 Megalign 프로그램에 대입한 후 전기에서 상술한 대로 다정렬을 수행한 후, Mega 소프트웨어의 Neighbor-Joining 법으로 계통수를 완성하여 균 동정을 실시하였다.

완성된 40주의 표준균주 데이터베이스가 실제로 균 동정에 적용될 수 있는 지를 확인하기 위하여, 위에서 상술한대로 비표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스 3주(KCTC 9030, KCTC 9031, KCTC 9069), 그리고 스트렙토미세스 알버스 2주(KCTC 1136, KCTC 1533)의 총 5주를 대상으로 비교염기서열 분석 방법에 의해 균 동정을 실시하였다.

그 결과, 비표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스 3주(KCTC 9030, KCTC 9031, KCTC 9069)는 각각 100%, 99.8%, 99.8%의 염기서열 동질성을 보이면서 계통수 상에서 표준 균주인 스트렙토미세스 하이드로스코피커스(KCTC 9782)에 위치함을 확인하였다[도 5]. 비표준 균주인 스트렙토미세스 알버스 2주(KCTC 1136, KCTC 1533)는 각각 99.8%, 100% 염기서열 동질성을 보이면서 계통수 상에서 표준 균주인 스트렙토미세스 알버스(KCTC 1082)에 위치함을 확인하였다[도 6].

본 발명의 효과

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 groEL2 유전자를 이용한 스트렙토미세스 속 균종 동정방법은 기존의 형태학적 분류법이 갖는 시간, 정확성의 문제점을 해소하며, 또한 요즘 일반적으로 사용되고 있는 16S rDNA 동정법이 갖는 시간, 비용상의 문제점을 해결하여 간편하고, 경제적이며 정확성이 높은 동정법을 제공함으로써 향후 스트렙토미세스 속 균종의 동정에 널리 이용될 수 있다.

청구항 1.

스트렙토미세스 균종의 groEL2 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키며, 서열번호 1의 염기서열로 표시되는 프라이머

청구항 2.

스트렙토미세스 균종의 groEL2 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키며, 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 프라이머.

청구항 3.

서열번호 3 내지 서열번호 42로 표시되는 염기서열로 이루어진 군에서 선택되며, 스트렙토미세스 속 균종의 groEL2의 분절 또는 이들의 단편인 폴리뉴클레오타이드.

청구항 4.

- 1) 스트렙토미세스 속 균주의 groEL2 유전자 분절을 특이적으로 증폭시키는 서열번호 1의 염기서열 또는 서열번호 2의 염기서열로 표시되는 프라이머를 이용하여 목적 균주의 groEL2 유전자 분절을 증폭하는 단계;
- 2) 상기 증폭된 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 분석하는 단계; 및
- 3) 상기에서 분석된 염기서열과 서열번호 3 내지 서열번호 42로 표시되는 염기서열로 이루어진 군에서 선택된 표준 균주의 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 비교하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 스트렙토미세스 속 균종의 동정방법.

청구항 5.

삭제

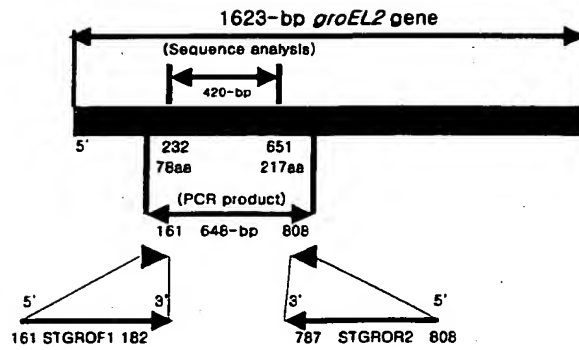
청구항 6.

삭제

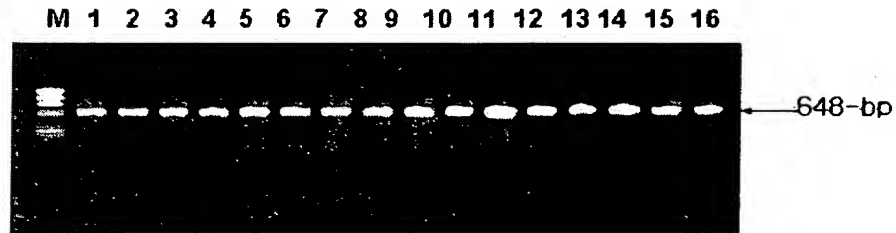
청구항 7.

제 4 항에 있어서, 상기 3) 단계에서 목적 균주의 groEL2 유전자 분절의 염기서열을 표준 균주의 groEL2 유전자 분절의 염기서열에 대입하여 다정렬한 후 계통도를 완성하여 결정하는 것을 특징으로 하는 동정방법.

도면1

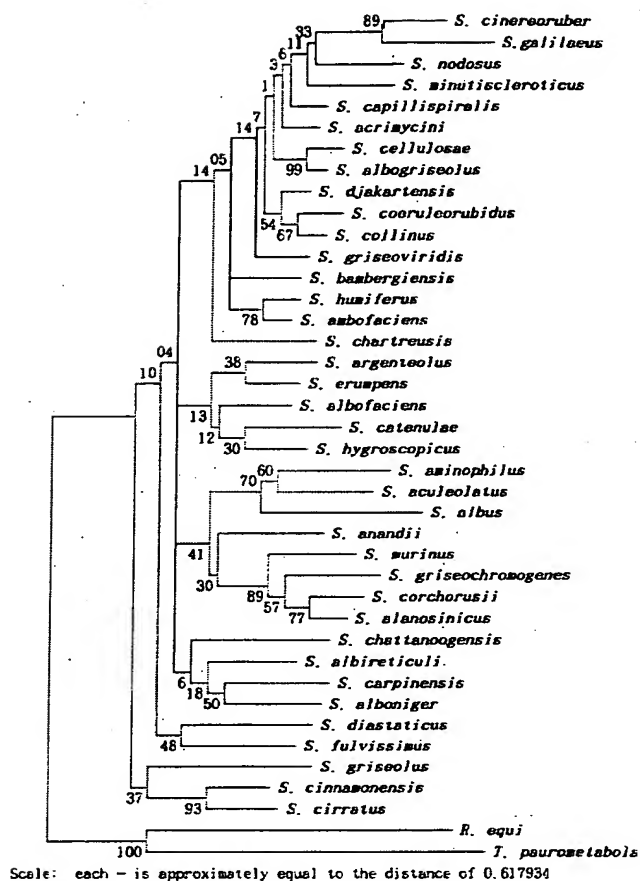


도면2

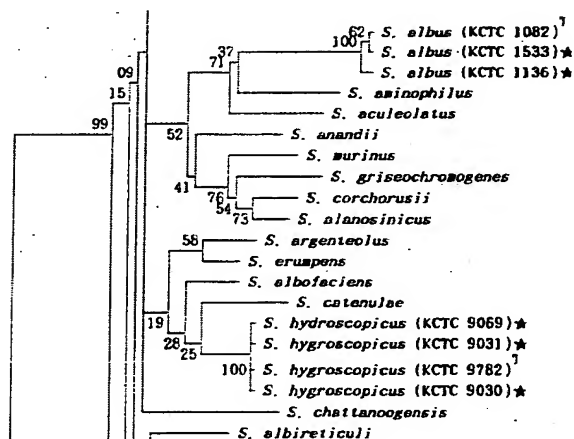


M: ϕ X174 DNA 크기 마커, 1: *S. aculeolatus*, 2: *S. albireticuli*,
 3: *S. elbofaciens*, 4: *S. albus*, 5: *S. aminophilus*,
 6: *S. argenteolus*, 7: *S. carpinensis*, 8: *S. charitensis*,
 9: *S. cinnamomensis*, 10: *S. coeruleorubidus*, 11: *S. diasteticus*,
 12: *S. erumpens*, 13: *S. griseolus*, 14: *S. hygrosopicus*,
 15: *A. equi*, 16: *T. paurometabola*

도면 9



도면 10



gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggctc ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtta tgcgcttcga caagggttac	360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgacccgtac	420
	420
<210> 4	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> <i>S. aculeolatus</i>	
<400> 4	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgaccaccg cgaccgtcct cgcccaggcc	60
ctggtcaagg agggcctgcg gaacgtggcc gccggcgcca acccgatggc gctgaagcgc	120
ggcatcgaga aggccaccga ggccgtctcc gccgccctgc tggagcaggc caaggacgtc	180
gagaccaagg agcagatcgc ctccaccgcc tccatctccg ccggcgacac ccagatcggc	240
gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggctc ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
tcgcagacct tcgggctgga gcttgagctc accgagggtca tgcgcttcga caagggttac	360
atctccgctt acttcgccac cgacatggag cgcattggagg cggagctcga ggacccgtac	420
	420
<210> 5	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> <i>S. alanosinicus</i>	
<400> 5	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgaccaccg cgaccgtgct cgcccaggcc	60
ctggtcaagg aaggcctgcg caacgtggcc gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc	120
ggtatcgaga agggcctcga ggccgtctcc gccgccctgc tggagcaggc gaaggacgtc	180
gagaccaagg agcagatcgc ctccaccgcc tccatctccg ccggcgacac ccagatcggc	240
gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggctc ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
agcaacacct tcggtctgga gcttgagctc accgagggtca tgcgcttcga caagggttac	360
atctccgctt acttcgcgac cgacatggag cgcattggagg cggtagctcga ggacccgtac	420
	420
<210> 6	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> <i>S. albireticuli</i>	
<400> 6	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgacgaccg cgaccgtcct cgcccaggcc	60
ctggtccgcg agggctctgc caacgtggcc gccggtgcca acccgatggc cctgaagcgt	120
ggcatcgaga agggcctcga ggccgtctcc gccgccctgc tggagcaggc caaggacgtc	180
gagaccaagg agcagatcgc ctccaccgcc tccatctccg ccggcgacac ccagatcggc	240
gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggctc ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
tcccagacct tcggtctgga gcttgagctc accgagggtta tgcgcttcga caagggttac	360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg cgtcgctcga cgacccgtac	420
	420
<210> 7	
<211> 423	
<212> DNA	
<213> <i>S. albofaciens</i>	
<400> 7	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgaccaccg cgaccgtcct ggcccaggcc	60
ctggtcacag cggagggcct gcgcaacgtc gccggcgccg ccaaccgat ggccctcaag	120
cgcggtatcg agcgcgcgt cgaggccgtc tccgccgcc tgcggagga ggccaaggac	180
gtggagacca aggagcagat ccctccacc gcctccatct ccggccgga caccagatc	240

ggcgagctga tcgccgagggc catggacaag gtcggcaagg aaggcgctcat caccgtcgag 300
gagtcccaga ccttcgggtct ggaactggag ctaccgagg gtatgcgctt cgacaagggc 360
tacatctcgg cgtacttcgc caccgacatg gagcgatagg aggcgtcgct cgacgacccg 420
tac 423
<210> 8
<211> 420
<212> DNA
<213> *S. albogriseolus*
<400> 8
aagaagacgg acgacgtcgc cgggtgacggg acgaccacgg cgaccgttct cgcccaggcc 60
ctgggtcaagg agggcctgcg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc 120
ggtatcgaga agggcgtcga ggccgtctcc gccgccctcc tggagcaggc gaaggacgtg 180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggtc ggcaaggaa ggcgtcatcac cgtcgaggag 300
tcccagacct tcgggtctgga gctggagctc accgagggta tgcgcttcga caagggttac 360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgaccgttac 420
420
<210> 9
<211> 420
<212> DNA
<213> *S. alboniger*
<400> 9
aagaagacgg acgacgtcgc cgggtgacggc acgacgacgg cgaccgtcct ggcccaggcc 60
ctgggtgcgcg aggggtctgcg caacgtggcc gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgc 120
ggcatcgaga agggcgtcga ggccgtctcc ggtgccctcc tcgagcaggc gaaggatgtc 180
gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggtc ggcaaggaa ggcgtcatcac cgtcgaggag 300
tcccagacct tcgggtctgga gctggagctc accgagggta tgcgcttcga caagggttac 360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcgctcga cgaccgttac 420
420
<210> 10
<211> 420
<212> DNA
<213> *S. albus*
<400> 10
aagaagacgg acgacgtcgc cgggtgacggc acgacgacgg cgaccgtcct ggcccaggcg 60
ctgggtccgcg aggggtctgcg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgc 120
ggtatcgagc agggccaccga ggctgtctcc gctgccctgc tggagcaggc caaggacatc 180
gagaccaagg agcagatcgc ctccaccggc tcgatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggtc ggcaaggaa ggcgtcatcac cgtcgaggag 300
tcgcagacct tcgggtctcga gctggagctc accgagggca tgcgcttcga caagggttac 360
atctccgcct acttcgccac cgacatggag cgcgatggagg ccgagctcga ggaccgttac 420
420
<210> 11
<211> 420
<212> DNA
<213> *S. ambofaciens*
<400> 11
aagaagacgg acgacgtcgc cgggtgacggg acgaccacgg cgaccgttct cgcccaggcc 60
ctgggtcaagg agggcctgcg caacgtcgcg gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc 120
ggcatcgaga agggcgtcga ggccgtctcc gccgccctgc tggagcaggc gaaggacgtc 180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240

gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaagggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggtctgga	gctggagctc	accgagggtta	tgcgcttcga	caagggttac	360
atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgatatggagg	cgtcgctcga	cgacccgtac	420
						420
<210>	12					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. aminophilus</i>					
<400>	12					
aagaagacgg	acgacgtcgc	ctgtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	ggcccaggcc	60
ctggtcaagg	agggcctgcg	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctgaagcgc	120
ggcatcgagc	gcgccaccga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tggagcaggc	gaaggacgtg	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccaccgcc	tccatctccg	ctgccgacac	ccagatcggc	240
gagctgacgc	ccgaggccat	ggacaagggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcgcagacct	tcggtctcga	gctggagctc	accgagggtta	tgcgcttcga	caagggttac	360
atctccgcct	acttcgccac	cgacatggag	cgcatggagg	cgagctgga	ggacccctac	420
						420
<210>	13					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. anandii</i>					
<400>	13					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	cgaccgtgct	cgcccaggcc	60
ctggtccgcg	agggcctgcg	caacgtggcc	gccggcgcca	acccgatggc	tctgaagcgc	120
ggtatcgaga	agggcgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tcgaccaggc	caaggagggtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccaccgcc	tccatctccg	ccgccgacac	ccagatcggc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaagggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcgcagacct	tcggtctgga	gctcgagctc	accgagggtta	tgcgcttcga	caagggttac	360
atctccgcct	acttcgccac	cgacatggag	cgcatggagg	cgtcgctcga	ggacccgtac	420
						420
<210>	14					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. argenteolus</i>					
<400>	14					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	cgaccgtcct	ggcccaggcc	60
ctggtccgcg	agggcctgcg	caacgtggcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctcaagcgc	120
ggtatcgaga	agggcgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tcgaccaggc	caaggacgtg	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccaccgcc	tccatctccg	ccgccgacac	ccagatcggc	240
gagctgacgc	ccgaggccat	ggacaagggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggtctgga	gctggaaactc	accgagggtta	tgcgcttcga	caagggttac	360
atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgcatggagg	cgtcgctcga	cgacccgtac	420
						420
<210>	15					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. bambergiensis</i>					
<400>	15					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	cgaccgttct	cgcccaggcc	60
ctggtcaagg	agggcctgcg	caacgtggcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctcaagcgc	120
ggtatcgaga	agggcgtcga	ggccgtctcc	ggcgccctgc	tggagcaggc	gaaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccaccgcc	tccatctccg	ccgccgacac	ccagatcggc	240

gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggct ggcaaggag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
tcccagacct tcggtctgga gctcgagctc accgaggga tgcgcttcga caagggtac	360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg cgtcgctcga cgaccctac	420
	420
<210> 16	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> <i>S. capillispiralis</i>	
<400> 16	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgaccaccg cgaccgtcct cgcccaggcc	60
ctggtcaagg agggcctgcg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc tctgaagcgc	120
ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc ggtgccctgc tggagcaggc gaaggatgtc	180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc	240
gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggct ggcaaggag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgaggga tgcgcttcga caagggtac	360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgaccctac	420
	420
<210> 17	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> <i>S. carpinensis</i>	
<400> 17	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcg	60
ctggtccgcg agggcctgcg caacgtggcc gccgggtgcc acccgatggc cctgaagcgc	120
ggcatcgaga aggccgtcga ggccgtctcg ggccgctcgc tcgaccaggc caaggaggtc	180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc	240
gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggct ggcaaggag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgaggga tgcgcttcga caagggtac	360
atctcggcgt acttcgcgac cgacatggag cgtatggagg cggcgctcga cgaccctac	420
	420
<210> 18	
<211> 422	
<212> DNA	
<213> <i>S. catenulae</i>	
<400> 18	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgacgaccg cgaccgtcct ggcccaggcg	60
ctggtccgcg agggcctccg taacgtcgcc gccggtgcc acccgatggc cctcaagcgg	120
ggcatcgaga ccgccgtcga ggccgtctcc gccgcctcgc tggagcaggc caaggacgtg	180
gagaccaagg agcagatcgc ttccgaccgc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc	240
gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggct ggcaaggag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgaggga tgcgcttcga caagggtac	360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg cgtcgctcga cgaccctac	420
at	422
<210> 19	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> <i>S. cellulosa</i>	
<400> 19	
aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggc acgaccaccg cgaccgtcct cgcccaggcc	60
ctggtcaagg agggcctgcg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc	120
ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccgccctgc tggagcaggc gaaggacgtg	180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacgt ccagatcggc	240

gagctcatcg ccgaggcgat ggacaagggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtg tgcgcttcga caagggttac 360
 atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgacccgtac 420
 420

<210> 20
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *S. chartreusis*
 <400> 20

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggg acgaccaccg cgaccgttct gggccaggcc 60
 ctggtcaagg agggcctgcg caacgttagc gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgc 120
 ggtatcgagc gtgccgtcga ggccgtctcc gccgccctgc tcgagcaggc caaggatgtc 180
 gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
 gagctcatcg ccgaggcgat ggacaagggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtg tgcgcttcga caagggttac 360
 atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cggatggagg cgtcgctcga cgacccgtac 420
 420

<210> 21
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *S. chattanoogensis*
 <400> 21

aagaagacgg actacgtcgc cggtagcggc acgacgaccg cgaccgtcct gggccaggcc 60
 ctggtccgcg agggcctgcg caacgttgcc gccgggtgcca acccgatggc gctgaagcgc 120
 ggtatcgaga agggcgtcga gtccgtctcc gccgccctgc tcgagcaggc gaaggatgtc 180
 gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
 gagctcatcg ccgaggcgat ggacaagggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtg tgcgcttcga caagggttac 360
 atctcggcgt acttcgcgac cgacatggag cgcgtggagg ccgtcctcga tgacccgtac 420
 420

<210> 22
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *S. cinnamonensis*
 <400> 22

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggg acgaccaccg ccaccgtcct gggccaggcc 60
 ctggtccgcg agggcctgcg caacgttgcc gccgggtgcca acccgatggc cctcaagcgt 120
 ggtatcgaga agggcgtcga ggccgtctcc gccgccctgc tcgcccaggc caaggatgtc 180
 gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
 gagctcatcg ccgaggcgat ggacaagggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggtg tgcgcttcga caagggttac 360
 atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgcgtggagg ccgtcctcga cgacccgtac 420
 420

<210> 23
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *S. cinereoruber*
 <400> 23

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggg acgaccaccg cgaccgttct gggccaggcc 60
 ctggtccgcg agggccttcg caacgttgcc gccggcgcca acccgatggc tctgaagcgc 120
 ggtatcgaga agggcgtcga ggccgtctcc ggtgccctgc tcgagcaggc gaaggatgtc 180
 gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240

gagctcatcg ccgaggcgat ggacaagggtc ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgaggga tgcgcttcga caagggtac 360
 atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgaccctac 420
 420

<210> 24
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *S. cirratus*
 <400> 24

aagaagacgg acgacgtcgc gggcgacgggt acgaccaccg ccaccgtgct ggcccaggcg 60
 ctggtccgag agggcctgag caacgtggcc gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgt 120
 ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccggcctgc tggagcaggc gaaggacgtc 180
 gagaccaagg agcagatcgc ttccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
 gagctcatcg ccgaggccat ggacaagggtc ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgaggga tgcgcttcga caagggtac 360
 atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgaccctac 420
 420

<210> 25
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *S. coeruleorubidus*
 <400> 25

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcgggt acgaccaccg cgaccgttct cgcccaggcc 60
 ctggtcaagg agggcctgag caacgtggcc gccggcgcca acccgatggc gctcaagcgc 120
 ggtatcgagc ggcgcgtcga ggccgtctcc gccggcctgc tggagcaggc gaaggacgtc 180
 gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
 gagctcatcg ccgaggccat ggacaagggtc ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgaggga tgcgcttcga caagggtac 360
 atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgaccctac 420
 420

<210> 26
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *S. collinus*
 <400> 26

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcgggt acgaccaccg cgaccgttct cgcccaggcc 60
 ctggtcaagg agggcctgag caacgtggcc gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgc 120
 ggtatcgagc ggcgcgtcga ggccgtctcc gccggcctgc tggagcaggc gaaggacgtc 180
 gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
 gagctcatcg ccgaggccat ggacaagggtc ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
 tcccagacct tcggtctgga gctggaactc accgaggga tgcgcttcga caagggtac 360
 atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgaccctac 420
 420

<210> 27
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> *S. corchorusii*
 <400> 27

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcgggt acgaccaccg cgaccgtgct cgcccaggcc 60
 ctggtcaagg agggcctgag caacgtggcc gccggcgcca acccgatggc tctgaagcgc 120
 ggtatcgaga aggccgtcga ggccgtctcc gccggcctgc tggagcaggc gaaggacgtc 180
 gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240

gagctgatcg ccgaggccat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
tccaacacct tcggtcttga gctggagctc accgagggca tgcgcttcga caagggctac 360
atctccgcct acttcgcgac cgacatggag cgcattggagg cgggtgctgga ggacccgtac 420
420

<210> 28
<211> 420
<212> DNA
<213> *S. diastaticus*
<400> 28

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggg acgaccaccg cgaccgtcct cgcccaggcg 60
ctcgtccgtg agggcctgcg caacgtggcc gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc 120
ggcatcgaga aggccgtcga ggcgctctcc ggccgacctg tgcgagaggc caaggacgtg 180
gagaccaagg agcagatcgc ctccaccgcc tccatctccg ccgccgacgt ccagatcggg 240
gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
tcccagacct tcggtctgga gctcgagctc accgaaggca tgcgcttcga caagggctac 360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg cgtccctcga cgacccgtac 420
420

<210> 29
<211> 420
<212> DNA
<213> *S. djakartensis*
<400> 29

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggg acgaccaccg cgaccgtcct cgcccaggcg 60
ctggtcaagg aaggcctgcg caacgtcgcc gccggcgcca acccgatggc cctgaagcgc 120
ggtatcgagc gcgccgtcga ggcgctctcc gccgacctg tggagcaggc gaaggacgtc 180
gagaccaagg agcagatcgc ctccaccgcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc 240
gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggtc ggcaaggaag gcgtcatcac cgtcgaggag 300
tcccagacct tcggtctgga gctggagctc accgagggta tgcgcttcga caagggctac 360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtccctcga cgacccgtac 420
420

<210> 30
<211> 423
<212> DNA
<213> *S. erumpens*
<400> 30

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggg acgaccaccg cgaccgttct ggcccaggcg 60
ctggtcacag ccgagggcct gcgcaacgtc gccggcgggc ccaacccgat ggccctgaag 120
cgcggtatcg agaaggccgt cgaaggcgtc tccgcccggc tgcctgagca ggccaaggac 180
gtggagacca aggagcagat cgttccacc gcctccatct ccgcccggc caccagatc 240
ggcgagctga tcgcccaggc catggacaag gtcggcaagg aaggcgtcat caccgtcgag 300
gagttccaga ctttcggtct ggaagctgga ctaccgagg gtatgcgctt cgacaagggc 360
tacatctcgg cgtactttgc caccgacatg gagcgcatgg aggccgcgct cgacgacccg 420
tac 423

<210> 31
<211> 420
<212> DNA
<213> *S. fulvissimus*
<400> 31

aagaagacgg acgacgtcgc cggtagcggg acgaccaccg cgaccgtcct cgcccaggcg 60
ctcgtcaagg aaggcctgcg caacgtcgcg gccggcgcca acccgatggc cctcaagcgc 120
ggcatcgaga aggccgtcga ggcgctctcc ggccgacctg tgcgagaggc caaggacgtg 180
gagaccaagg agcagatcgc ttcgaccgcc tccatctccg ccgcccacac ccagatcggc 240

gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcgcagacct	tcggtctgga	gctcgagctc	accgagggca	tgcgcttcga	caaggggtac	360
atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgacccgtac	420
						420
<210>	32					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. galilaeus</i>					
<400>	32					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	cgaccgttct	cgcccaggcg	60
ctggtccgcg	agggcctgcg	caacgtggcg	gccggcgcca	acccgatggc	tctgaagcgc	120
ggcatcgaga	agggcgtcga	ggccgtctcc	ggcgccctcc	tcgagcaggc	gaaggatgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttcgacggcc	tccatctccg	ccgccgacac	ccagatcggc	240
gagctcatcg	ccgaggcgat	ggacaaggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	ggtcgaggag	300
tcgcagacct	tcggtctcga	gctcgagctc	accgagggca	tgcgcttcga	caaggggtac	360
atctcggcgt	acttcgcgac	cgacatggag	cgtatggagg	ccgtcctcga	cgacccgtac	420
						420
<210>	33					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. griseochromogenes</i>					
<400>	33					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	cgaccgtcct	ggcccaggcc	60
ctggtcaagg	aaggcctcgc	caacgtcgcc	gccggcgcca	acccgatggc	tctgaagcgc	120
ggatcgcaga	agggcgtcga	ggccgtctcc	gccggccctcc	tcgagcaggc	gaaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccaccgcg	tccatctccg	ccgccgacac	ccagatcggc	240
gagctgatcg	ccgaggccat	ggacaaggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
agcaacacct	tcggtctgga	gctcgagctc	accgagggca	tgcgcttcga	caaggggtac	360
atctccgcct	acttcgcgac	cgacatggag	cgcgtggagg	cgccgctcga	ggacccgtac	420
						420
<210>	34					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. griseolus</i>					
<400>	34					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	ccaccgttct	cgcccaggcg	60
ctcgtccgtg	agggcctgcg	caacgtcgcc	gccggtgcca	acccgatggc	tctcaagcgt	120
ggcatcgaga	agggcgtcga	ggccgtctcc	gccggccctgc	tggagcaggc	caaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttcgaccgcc	tccatctccg	ccgccgacac	cgagatcggc	240
gccaagatcg	ccgaggcgat	ggacaaggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tcggtctgga	gctggaactc	accgagggta	tgcgcttcga	caaggggtac	360
atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgtatggaga	cgtcgttcga	cgacccgtac	420
						420
<210>	35					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. griseoviridis</i>					
<400>	35					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	cgaccgtcct	cgcccaggcc	60
ctggtcaagg	agggcctgcg	caacgtagcc	gccggcgcca	acccgatggc	cctgaagcgc	120
ggatcgcaga	agggcgtcga	ggccgtctcc	gccggccctgc	tggagcaggc	gaaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccaccgcc	tccatctccg	ccgccgacac	ccagatcggc	240

gagctgatcg	ccgaggccat	ggacaagggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tgggtctgga	gctggagctc	accgagggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgtatggagg	ccgtgctcga	cgacccgtac	420
						420
<210>	36					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. humiferus</i>					
<400>	36					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	cgaccgttct	cgcccaggcc	60
ctggtcaagg	aaggcctgcg	caacgtcgcg	gccggcgcca	acccgatggc	cctgaagcgc	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tcgagcaggc	caaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tcgatctccg	ccgccgacac	ccagatcggc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaagggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tgggtctgga	gctggagctc	accgagggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgacccgtac	420
						420
<210>	37					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. hygrosopicus</i>					
<400>	37					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	ggcccaggcc	60
ctggtccgcg	aggccctgcg	caacgtcgcg	gccggcgcca	acccgatggc	cctcaagcgc	120
ggtatcgagc	gtgccgtcga	ggccgtctcc	gccgccctgc	tggagcaggc	caaggacgtg	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ttcgaccgcc	tccatctccg	ccgtgcacac	ccagatcggc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaagggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tgggtctgga	gctggagctc	accgagggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgtatggagg	cgtcgctcga	cgacccgtac	420
						420
<210>	38					
<211>	420					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. minutiscleroticus</i>					
<400>	38					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgacgaccg	cgaccgtcct	ggcccaggcc	60
ctggtccgcg	aggccctgcg	caacgtcgcg	gccggcgcca	acccgatggc	cctgaagcgc	120
ggtatcgaga	aggccgtcga	ggccgtctcc	ggtgccctgc	tggagcaggc	gaaggacgtc	180
gagaccaagg	agcagatcgc	ctccacggcc	tccatctccg	ccgccgacgt	ccagatcggc	240
gagctcatcg	ccgaggccat	ggacaagggtc	ggcaagggaag	gcgtcatcac	cgtcgaggag	300
tcccagacct	tgggtctgga	gctggagctc	accgagggta	tgcgcttcga	caagggctac	360
atctcggcgt	acttcgccac	cgacatggag	cgtatggagg	ccgtcctcga	cgacccgtac	420
						420
<210>	39					
<211>	423					
<212>	DNA					
<213>	<i>S. murinus</i>					
<400>	39					
aagaagacgg	acgacgtcgc	cggtgacggc	acgaccaccg	cgaccgtcct	cgcccaggcc	60
ctggtcacag	cggaaggcct	gcgcaacgtc	gccgccggtc	ccaacccgat	ggccctgaag	120
cgccggtatcg	agaaggccgt	cgaggccgtc	tccgccgcc	tgttcgagca	ggccaaggac	180
gtcagagacca	aggagcagat	cgctccacc	gcgtccatct	ccgccgccga	cacccagatc	240

ggcgagctga tgcgcgaggc gatggacaag gtcggcaagg aaggcgatcat caccgtcgag	300
gagagcaaca ctttcggtct ggagcttgag ctaccgagg gcatgcgctt cgacaagggc	360
tacatcttcg cctacttcgc caccgacatg gagcgcatgg aggcgtcgct cgacgacccg	420
tac	423
<210> 40	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> S. nodosus	
<400> 40	
aagaagacgg acgacgtcgc cgggtgacggc acgaccaccg cgaccgtgct cgcccaggcg	60
ctggtccgcg agggcctgcg caacgtcgcg gccgggtgcc acccgatggc cctgaagcgc	120
ggatcgcaga aggcctgcga ggccgtctcc accgccctgc tggagcaggc gaaggacgtc	180
gagaccaagg agcagatcgc ctccacggcc tccatctccg ccgccgacac ccagatcggc	240
gagctgacgc ccgaggccat ggacaaggct ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
tcgcagacct tcgggtctcga gctcgagctc accgagggca tgcgcttcga caagggtac	360
atctcggcgt acttcgccac cgacatggag cgtatggagg ccgtcctcga cgacccgtac	420
	420
<210> 41	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> R. equi	
<400> 41	
aagaagaccg acgacgtcgc tgggtgacggc accacgacgg ctacggctct ggctcaggcg	60
ctcgtccgcg agggcctgcg caacgtcgcg gccgggtgcc acccgctggg tctgaagcgc	120
ggcatcgcga aggcctgcga ggccgtcacc gccaaagctgc tcgacaccgc caaggaggtc	180
gagaccaagg agcagatcgc tgccaccgcc gggatctcgg cgggcgactc cagcatcggc	240
gagctcatcg ccgaggcgat ggacaaggct ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
tcgaactcct tcggcctcga gctcgagctc accgagggta tgcgcttcga caagggtac	360
atctcgttgt acttcgcgac cgacgccgag cgtcagggaag cggtcctcga ggatccgtac	420
	420
<210> 42	
<211> 420	
<212> DNA	
<213> T. paurometabola	
<400> 42	
aagaagaccg acgacgtcgc gggcgacggc accaccaccg ccaccgttct ggcccaggcg	60
ctcgtgcgcg agggctctgc caacatggct gccgggtcga acccgctggg cctcaagcgg	120
ggcatcgcga aggcctgcga ggccgtgacc gagcacctgc tcaaggaggc caaggaggctc	180
gagaccaagg agcagatcgc tgctaccgcg ggcatctcgg ccggcgaccc cgccatcggc	240
gagctcatcg ccgaggccat ggacaaggct ggcaagggaag gcgtcatcac cgtcgaggag	300
agcaacacct tcgggtctcca gctggagctc accgagggca tgcgcttcga caagggttc	360
atctcggcgt acttcgccac cgacgccgag cgtcaggagg ccgtgctcga ggacgcctac	420
	420